

# マイナー組織適合性抗原 H60 と構造的に類似した 新規 NKG2D リガンド H60b と H60c の同定

## 学位論文内容の要旨

ナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) は、骨髄前駆細胞に由来するリンパ球である。T 細胞、B 細胞と異なり、NK 細胞の表面には遺伝子再構成を行う抗原受容体は発現されておらず、NK 細胞は自然免疫系の細胞とみなされている。本細胞はウイルス感染細胞、腫瘍細胞を破壊するうえで重要な役割を担っている。NK 細胞の表面には活性化受容体と抑制性受容体が発現されており、この二者から伝達されるシグナルのバランスにより NK 細胞傷害活性が制御されている。マウスの代表的な NK 細胞受容体として、古典的な主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC) クラス I 分子を認識する Ly49 ファミリーと、非古典的な MHC クラス I 分子を認識する NKG2 ファミリーが知られている。マウス NKG2 ファミリーのうち、NKG2A は抑制性受容体であり、NKG2C、NKG2D、NKG2E は活性化受容体である。このうち、NKG2D は NK 細胞の主要な活性化受容体と考えられている。マウス NKG2D のリガンドには、1) レチノイン酸刺激により誘導される分子群の RAE-1 $\alpha$ 、- $\beta$ 、- $\gamma$ 、- $\delta$ 、- $\epsilon$ 、2) マイナー組織適合性抗原として同定された H60 (Histocompatibility-60)、3) UL16-binding protein like transcript-1 (MULT-1) の 7 分子が現在知られている。本研究では、マウスの遺伝子データベースを検索することにより、H60 と相同性の高い 2 つの遺伝子 H60b および H60c を発見し、いずれも NKG2D リガンドとして機能することを見いだしたので報告する。

マウス H60 分子のアミノ酸配列 (GenBank、NP\_034530.1) をクエリー配列として、マウス EST データベースを BLAST 探索することにより、H60 と有意の配列相似を示す 46 本の EST 配列が同定された。これらのアミノ酸配列は大きく 3 種に分類され、1 つは既知の H60 遺伝子に対応する配列であり、他の 2 つは既知の H60 配列と似てはいるが、異なる配列であった。そこで、後二者の配列をコードする遺伝子を H60b、H60c と名付けた。これらの EST 配列をもとに、RACE 法により完全長 cDNA 配列を決定した。H60b の完全長 cDNA は 1,029 bp からなり、251 アミノ酸残基よりなるタンパク質をコードする open reading frame (ORF) を含んでいた。cDNA 配列から予想される H60b 分子は、24 アミノ酸残基よりなるシグナルペプチド、MHC クラス I 分子の  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  ドメインと配列相似を有する細胞外ドメイン ( $\alpha 1$  ドメインは 62 アミノ酸残基、 $\alpha 2$  ドメインは 88 アミノ酸残基)、23 アミノ酸残基よりなる膜貫通領域と細胞内領域からなる I 型の膜タンパク質であった。一方、H60c 完全長 cDNA は 1,074 bp からなり、197 アミノ酸残基よりなる ORF を含んでいた。cDNA 配列から予想される H60c 分子は、17 アミノ酸残基よりなるシグナルペプチドと各々、62、88 アミノ酸残基よりなる  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  細胞外ドメインをもつが、H60b と異なり、膜貫通領域

は予測されなかった。さらに、H60b、H60c 分子と既知のクラス I 分子との関係を明らかにするために、細胞外ドメインのアミノ酸配列を用いて、代表的なヒトおよびマウスのクラス I 分子を含む分子系統樹を作成し、系統樹解析を行った。この結果、1) H60b、H60c は既知のクラス I 分子の中で、H60 に最も類似していること。2) H60b と H60c では、H60b の方が H60 と高い相似性を有していることが示された。

H60c 分子のアミノ酸配列からは膜貫通領域が同定されない。そこで、H60c 分子が GPI アンカーを介して細胞膜に付着している可能性を検討するために、FLAG・標識発現ベクター pFLAG-CMV-3 に H60、H60b または H60c cDNA を組み込み、培養細胞 COS-7 にトランスフェクションし、FLAG タグのついた H60、H60b、H60c 分子を一過性に発現させた。H60c トランスフェクタントでは、PI-PLC 処理により、抗 FLAG 抗体との反応性が低下することから、H60c は GPI アンカー型のタンパク質であることが示された。また、これらのトランスフェクタントを用い、NKG2D との結合性を、マウス NKG2D-human IgG Fc fusion protein と反応させることで、フローサイトメトリーにて解析した。この結果、H60b、H60c は H60 同様に NKG2D に結合することが確認された。

マウス諸臓器での mRNA 発現量を比較するために各遺伝子について、リアルタイム RT-PCR を行った。この結果、H60 は既報のように、B6 マウスでは発現が認められなかった。一方、BALB/c マウスでは胸腺、リンパ節、脾臓、筋肉などで発現が認められた。H60b は B6、BALB/c マウスともに、ほとんどの臓器で発現が認められた。H60c は肺、皮膚および卵巣などの限られた臓器で発現する傾向が認められた。

NKG2D リガンドは、さまざまなストレスによって、その発現が誘導されることが知られている。そこで培養細胞を 5-FU、MMC、UV、熱ショックで処理し、H60a、H60b、H60c の転写が誘導されるか否かを検討した。野生マウス由来の線維芽細胞株 SC-1 では 5-FU 処理により、A/Sn マウス由来の NK 細胞感受性のリンパ腫細胞株 YAC-1 では 5-FU または MMC 処理により H60 と H60c の発現亢進が認められた。UV 照射、熱ショック処理は、どの H60 リガンドの発現も誘導しなかった。

H60、H60b、H60c 遺伝子の cDNA 配列とゲノム配列を比較することにより、エキソン・イントロン構造を決定した。H60 遺伝子は 6 個のエキソンからなり、エキソン 1 から 6 は各々、5'非翻訳領域 (5'UTR)、開始コドンを含むシグナル配列 (SP)、 $\alpha 1$  細胞外ドメイン、 $\alpha 2$  細胞外ドメイン、膜貫通領域と細胞内領域 (TM+CYT)、終止コドンを含む細胞内領域と 3'非翻訳領域 (CYT+3'UTR) をコードしている。H60b、H60c 遺伝子のエキソン・イントロン構造は、基本的に H60 遺伝子のそれと同一であるが、H60c 遺伝子では終止コドンが exon 5 に位置していた。マウスのゲノムデータベースを検索することにより、H60b 遺伝子は、H60 遺伝子と近接して、第 10 染色体の 21,962 kb から 21,978 kb の領域に位置しており、H60b 遺伝子の exon 1 は *Rae1*  $\alpha$  遺伝子の exon 1 としても使われていることが明らかになった。一方、H60c 遺伝子は、第 10 染色体の 7,078 kb から 7,089 kb の領域に位置していることが判明した。三つの H60 遺伝子 (H60、H60b、H60c) は、直列重複によって誕生した遺伝子と考えられるが、これら三者のなかで最も配列相似の低い H60c 遺伝子は、H60、H60b 遺伝子と離れて存在している。直列重複がおきた後に、H60c 遺伝子は同一染色体内で転座した可能性が考えられる。

今後、H60b、H60c が実際に NK 細胞を活性化する能力をもっているか否かを検討する必要がある。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 笠原 正典

副査 教授 小野江 和則

副査 教授 瀬谷 司

学位論文題名

## マイナー組織適合性抗原 H60 と構造的に類似した 新規 NKG2D リガンド H60b と H60c の同定

マウスの代表的な NK 細胞活性化受容体 NKG2D のリガンドの一つに、マイナー組織適合性抗原 H60 が知られている。本研究では、マウス遺伝子データベースに基づき、H60 と相同性の高い 2 種の新規 cDNA, H60b と H60c をクローニングした。クラス I 分子を含む分子系統樹解析を行ったところ、H60b, H60c はクラス I 分子の中で、H60 に最も類似しており、NKG2D リガンドとして機能することが予想された。実際に遺伝子導入を行い、培養細胞に発現させたところ、H60b, H60c のいずれも NKG2D リガンドとして機能することが見いだされ、また、H60c は GPI アンカー型のタンパク質であることが証明された。マウス諸臓器での mRNA 発現量は、H60b はほとんどの臓器で発現が認められたが、H60c は肺、皮膚および卵巣などの限られた臓器で発現する傾向が認められた。培養細胞を用いた転写誘導実験では、抗がん剤処理により H60 と H60c の発現亢進が認められた。ゲノム構造を解析すると、H60 遺伝子は 6 個のエキソンからなり、H60b, H60c も基本的に H60 遺伝子と同一であるが、H60c 遺伝子では終止コドンが exon 5 に位置しているため、膜貫通部位をコードする領域を欠く。この三つの H60 遺伝子 (H60, H60b, H60c) は、直列重複によって誕生した遺伝子と考えられる。

公開発表において、副査の瀬谷 司教授より、NKG2D のリガンドが複数存在する生物学的意義、H60b, H60c 分子の発現制御機構と遺伝子のプロモーター配列の解析について、ウイルスの感染保有細胞とみなされている樹状細胞での H60b, H60c の発現などについて質問があった。これらの質問に対して申請者は、外来ウイルスに対する最初の生体防御機構として、イムノグロブリンなどの遺伝子再構成を起こす生体分子と異なり、分子の再構成を起こさずに分子の種類を増やすことにより、免疫監視を行うのではないかと概ね適切に回答した。発現制御機構の解析、樹状細胞での発現などについては今後の検討課題であることを明らかにした。次いで、副査の小野江 和則教授より、NKG2D ファミリーの中で活性化受容体と抑制性受容体の違いとシグナル伝達分子の相違、H60 の発現については、C57BL/6 と BALB/c マウス系統間で差が認められるが、ゲノム配列上に差は存在するか、マイナー組織適合性抗原として H60 は直接キラー T 細胞に認識されるのか、あるいは MHC Class I 分子により抗原提示されるのか、臓器別の発現では肺などでは、C57BL/6 では発現は見られるが、BALB/c では発現が見られない理由、BALB/c と C57BL/6 は各々 Th1 タイプ、Th2 タイプの代表的マウス系統と考えられているが、この観点からさらに検討を進めると興味深いことが見つかるのではないかと、などについての質問と助言を受けた。これらの質問に対し申請者は活性化受

容体のマウス NKG2D はホモ 2 量体を形成し、DAP10 などの ITAM を持つシグナル伝達サブユニットを動員すること、これに対し抑制性受容体の NKG2A, C, E は CD49 とヘテロ 2 量体を形成し、細胞内領域に存在する ITIM のチロシン残基のリン酸化によりフォスファターゼ活性が誘導されることが現在までに知られていることを明らかにした。H60 の発現の差については、現在のゲノムデータベース上は C57BL/6 と BALB/c マウス系統間で基本的な差は認められず、これから解明する課題であること、臓器別の発現差についてもプロモーター領域の解析を含め、今後の検討課題であることを明らかにした。マイナー組織適合性抗原として H60 は $\alpha$ 1細胞外ドメインの8ペプチドが MHC Class I 分子により抗原提示されることが、H60 の発見者によって報告されていることなどほぼ妥当な回答をした。最後に、主査の笠原正典教授より、Rae-1 ファミリーでは $\alpha$ から $\epsilon$ 迄の 5 分子がすぐに発見されているが、H60 ファミリーでは H60 の発見から、今回の H60b と H60c の発見まで時間がかかっているが、後二者が見つかり難かった理由、H60b と H60c は臓器別に発現パターンが異なっており、分子機能上で役割分担がなされていることが示唆されること、などについての質問と助言を受けた。この質問に対し申請者はマウス EST データベース上で見つかった、H60 と相似を示す分子の頻度を基に H60b と H60c は H60 に比べ発現が低いのではないかと回答した。

この論文は、マイナー組織適合抗原 H60 と構造的に類似した新規 NKG2D リガンド H60b と H60c を同定したことで高く評価され、今後 NK 細胞受容体を介した免疫監視機構の解明に役立つと期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。